体外診断用医薬品　　　　　　　　　　**2009 年 11 月改訂
製品番号 6604110　　　　　　　　　　*2007 年 2 月改訂
承認番号 21700AMY00059000

日本標準商品分類番号
877449

*単球キット
サイトスタット
MY4-FITC

ご使用に際しては、本添付文書をよくお読みください。

全般的な注意

1. 本品は、体外診断用でありそれ以外の目的に使用しないでください。
2. 診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。
3. 添付文書等に記載した内容以外の方法で使用した場合には、保証しません。
4. ご使用にあたっては、測定装置の取扱説明書をよく読んでから使用してください。

形状・構造等（キットの構成）

構成試薬名	成分	分量
モノクローナル抗体試薬		
	フルオレセインイソチオシアネート結合 抗ヒト CD14 マウスモノクローナル抗体 MY4	0.11μg/テスト

＊フルオレセインイソチオシアネート：FITC と略記

抗体以外の各種成分と濃度

1 バイアル（0.5mL）中

BSA	：0.2%
リン酸カルシウム	：0.01M
NaCl	：0.15M
NaN_3	：0.1%
スタビライザー	

対象抗原：

CD14（分子量　55kD）

CD14 抗原は、グリコシルフォスファチジルイノシトール（GPI）アンカー型の細胞膜糖タンパクで、LPS（細菌のリポ多糖）及び LBP（リポ多糖結合タンパク）の複合体に対する高親和性レセプタであることが明らかとなっています。骨髄系分化抗原の 1 つで、骨髄前駆細胞には発現せず、前単球など単球系に分化した細胞に強く発現します。正常末梢血単球の約 85%が MY4 陽性となります。MY4 抗体は、同じ CD14 である Mo2 抗体とは異なるエピトープを認識しており、顆粒球にも弱く反応します。

クローン：

322A-1（MY4）
急性骨髄単球性白血病細胞で免疫した BALB/cJ マウス脾臓細胞と、マウス骨髄腫 P3/NS1/1-AG4-1 細胞との融合細胞から分離

Ig 構造：

マウス Ig2b-H 鎖及びκ−L 鎖

細胞毒性：

補体依存性

原料及び精製法：

マウス腹水または融合細胞の培養上清よりイオン交換クロマトグラフィで精製

標識：

FITC（Fluorescein Isothyocyanate）

FITC／抗体タンパク比	：	5～10
励起波長	：	468～509nm
蛍光波長	：	504～541nm

使用目的

ヒト白血球表面抗原（CD14）の分析及び単球の測定

測定原理

フローサイトメトリーによる直接免疫蛍光法

測定には、488nm で励起し、525（504～541）nm の蛍光を検出できるフローサイトメーターが必要です。

操作上の注意

1. 本品はフローサイトメトリー専用試薬です。蛍光顕微鏡には使用できません。
2. 本品は全血検体用に調製されており、新鮮または凍結保存した分離単核球検体への使用は不適当です。
3. 抗凝固剤として EDTA の他にヘパリン等も使用可能ですが、いずれを用いて採血した場合でも採血後は常温に保存し、24 時間以内に測定してください。
4. 末梢血検体の場合、細胞のバイアビリティ（生残率）は 90%以上が理想的ですが、異常検体ではこれを下回ることがあります。白血病細胞などでは、保存により急激に生残率の低下を来す場合があるため、注意が必要です。
5. 白血病検体など白血球数が 10,000 個/mm^3 を超える検体は、同一患者の血漿を用いて白血球数が 10,000 個/mm^3 以下になるように希釈してください。
6. 全血法によるサンプル処理では、赤血球の溶血残渣や溶血されなかった赤血球が誤差要因となるので、溶血操作を確実に行ってください。試験管上部壁面に付着した血液飛沫は溶血操作の前に綿棒等で除去してください。
7. タンパク濃度が異常な場合や、有核赤血球、ヘモグロビン合成異常では赤血球の溶血が不完全となることがあります。この場合、溶血していない赤血球がリンパ球としてカウントされるために陽性率が実際よりも低くなるおそれがあるので十分に注意してください。
8. 溶血時間が長いと、白血球にもダメージが及ぶ場合があります。
9. 単球系の細胞は他の白血球に比べて抗体タンパクの非特異的な結合が著しいため、できるだけ対照には CYTO-STAT/COULTER CLONE MSIg2b-FITC などの陰性コントロール抗体試薬を使用してください。
10. フローサイトメーターのレーザ光軸の調整不良や感度及びゲートの不適切な設定により、誤った結果が得られる場合があります。
11. 白血病細胞など抗原の発現量に異常がみられる場合や溶血残渣が多く測定が困難な場合は、すべての試験管に PBS を 3mL 加えて 400～450×g で 5 分間遠心分離し、上清を除去した後、沈渣を適量の PBS に再浮遊させてから測定すると解析が容易になります。

用法・用量（操作方法）

【試薬の調製】

モノクローナル抗体はそのまま使用します（10μL／テスト）

【その他必要な試薬】

1. 溶血試薬（イムノプレップ試薬システム）

製品番号 7546999　容量 300 テスト
（TQ-Prep、Multi-Q-Prep™ 用）
製品番号 7546946　容量 100 テスト（Q-Prep 用）

イムノプレップ試薬システムは、自動サンプル処理装置専用の溶血・固定試薬で、以下の試薬から構成されています。

a）イムノプレップ A（溶血試薬）
b）イムノプレップ B（反応停止試薬）
c）イムノプレップ C（固定試薬）

注）コールター全血ライジングキット（製品番号 6603152）など、他の溶血試薬を用いる場合は、溶血試薬の添付文書に従って調製、使用してください。

2. PBS（リン酸緩衝生理食塩水（溶血後に洗浄が必要な場合に使用）

PBS バッファ（製品番号 6603369）1 パックを蒸留水 500mL に溶解します。調製後の pH は 7.2±0.2 で、防腐剤等は含んでいません。

3.　陰性コントロール試薬（アイソタイプコントロール抗体）

サイトスタット／コールタークローン MsIg2b-FITC
製品番号 6603034　容量 50 テスト（0.5mL）

【検体の採取と調整】

検体には、抗凝固剤（EDTA 推奨）を用いて採血した末梢血を使用します。試験管１本につき 100μLの血液を用いるため、測定項目数＋対照の試験管分と検体希釈用の自己血漿採取分として、通常 1 検体につき 1～2mL の血液が必要となります。

白血球数が 3～10×10^3 個/mm^3 であることが染色を行ううえで理想的で、検体中の白血球数がこの範囲を外れる場合には、希釈*またはバフィーコート法などにより濃縮して白血球数を調整してください。また、採血後の検体を保存する場合は室温（20～25℃）で保存し、できるだけ採血後 6 時間以内に操作を開始してください。

* 溶血試薬にイムノプレップ試薬システムを用いる場合は、検体の希釈や白血球数の調整には同一患者検体の血漿（自己血漿）を用いてください。

【参考：白血球数の調整法】

a）白血球数が多い検体の場合（＞10×10^3 個/mm^3）

白血球数			希釈倍数
10～20	×10^3	:	2 倍
20～30	×10^3	:	3 倍
30～40	×10^3	:	5 倍
40～60	×10^3	:	6 倍
60～100	×10^3	:	10 倍
100～200	×10^3	:	20 倍

b）白血球数が少ない検体の場合（＜3×10^3 個/mm^3）
バフィーコート法
（1） 検体を 25℃で 500×g、5 分間遠心分離します。
（2） 白血球の層をパスツールピペットで採取します。この際、すべての白血球を確実に回収するため赤血球及び血漿も一部回収します。
（3） 数回ピペッティングして、十分に懸濁させます。
（4） コールターLH 700 シリーズ等のヘマトロジーアナライザーや血球計算板を用いて細胞濃度を測定します。
（5） 自己血漿で細胞濃度を 3～10×10^3 個/mm^3 に調整します。

【操作方法】

溶血試薬にイムノプレップ試薬システムを用いる方法（Q-Prep 法）

注）イムノプレップ試薬システム以外の溶血試薬を用いる場合は、溶血試薬の添付文書に従って操作してください。

1） テスト用と対照用に 12mmφ×75mm の試験管を用意します。
2） それぞれの試験管に全血 100μL を分注します。管壁に付着した血液は綿棒等で拭き取ってください。
3） モノクローナル抗体試薬 10μL をテスト用の試験管に加えます。対照用の試験管にはコントロール試薬（サイトスタット／コールタークローン MSIg2b-FITC、別売）を 10μL 加えます。
4） よく撹拌した後、室温で 10 分間反応させます。
5） 試験管を TQ-Prep（または Q-Prep）で溶血・固定処理します。
注 1： ベックマン・コールター社製フローサイトメーター以外の装置（前方散乱光を狭角で検出する装置）で測定する場合は、溶血後に脱イオン水または蒸留水を 0.5mL 加えてください。
注 2： 白血病細胞など抗原の発現強度に異常がみられる検体を測定する場合は、操作上の注意の 11 を参照してください。
6） フローサイトメーターで測定します。
調製したサンプルは、室温で 2 時間まで保存できます。2 時間を超える場合は、2～8℃で遮光保存し、調製後 24 時間以内に測定してください。

測定結果の判定方法

1. 正しく調整されたフローサイトメーターを使用してください。
2. 前方散乱光（FS）と側方（90°方向）散乱光（SS）のサイトグラム上で明瞭な白血球 3 分画（リンパ球、単球、顆粒球）が得られるように FS のスレッショルドと散乱光のゲインを確認、調整します。
3. 白血球領域全体及びリンパ球、単球など任意の白血球集団に解析ゲートを設定し、FITC 蛍光（Log スケール）の 1 パラメータ蛍光ヒストグラムを取得します。対照用のサンプルで蛍光陽性領域を設定します。

【ヒストグラム例】

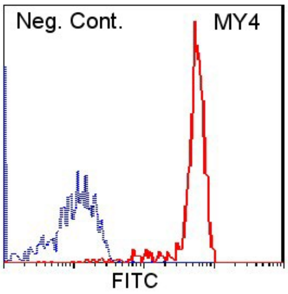
本品による健常者末梢血測定ヒストグラム例

陰性コントロール抗体試薬

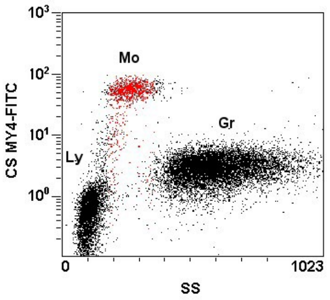
（Neg. Cont.）：　サイトスタット／コールタークローン MsIg2b-FITC

フローサイトメーター：　EPICS® XL

ゲート：　単球領域



ゲート：　全白血球



1）FLOW-COUNT（細胞絶対数測定用試薬、製品番号 7547053）の併用による方法
簡便かつ高精度の測定が可能です。詳細は当該製品の添付文書を参照してください。

2）CD14 陽性率及び白血球数算定の結果から算出する方法
絶対数（（個/mm^3）＝
白血球数（個/mm^3）×全白血球領域 CD14 陽性率%／10^2

【測定条件の確認】

健常者の末梢血などを用いて、フローサイトメーターの設定やゲーティングなどの測定条件の正確性を確認できます。

検体ごとに抗体の非特異的な結合を確認するため、適切なアイソタイプコントロール試薬（サイトスタット／コールタークローン MSIg2b-FITC）を用います。健常者検体の場合、コントロール試薬の陽性率は通常 1～2%となります（2%を上回る場合、測定結果は誤差を含んでいるおそれがあります）が、腫瘍検体ではより高い値を示すことがあります。

【測定結果の判定方法】

1）自社施設で測定した本品の正常参考値は以下のとおりでした。
CD14 陽性率（全白血球領域）±SD：7.6±2.2%　n＝20
これはあくまでも期待値の一例であり、施設ごと期待値を設定してください。
2）末梢血では、リンパ球は CD14 陰性、単球は CD14 陽性、顆粒球は CD14 弱陽性です。単球の CD14 を測定する場合は、単球ゲートへのリンパ球や顆粒球の混入に注意してください。
3）GPI アンカー型の細胞膜タンパクを欠く発作性夜間血色素尿症（PNH）患者の単球は、CD14 が陰性となる可能性があります。
4）病態と特定の白血球集団の変動が常に一致するわけではないので、測定結果は臨床及び他の診断データにも十分注意して判定してください。
5）測定結果の解釈にあたっては、測定条件及び供血者の年令、性別、喫煙習慣等の影響も考慮してください。

臨床的意義

リンパ球、単球、顆粒球など白血球の亜集団は、その細胞系統や分化成熟段階に、あるいは機能的サブセットに特有の細胞表面抗原を有しており、それらの発現を利用することによって同定が可能です。

また、血液細胞の腫瘍である白血病／リンパ腫の細胞系統を調べるには、形態学的情報及び細胞化学染色、遺伝子再構成の検出、染色体異常の検出などとともに、細胞表面抗原の分析が非常に有用です。とくに、リンパ系腫瘍の分類や、骨髄系腫瘍でも形態的な判別が困難な場合には、細胞表面抗原の分析は欠くことのできないものとなっています。

本品は、単球系細胞の代表的分化マーカーである CD14 抗原に特異的に結合する MY4 モノクローナル抗体によって末梢血の単球や単球系の形質を有する骨髄性の白血病を測定するもので、バックグラウンドの蛍光強度が低く、フローサイトメトリーによる No-Wash 法に最適化されたモノクローナル抗体試薬です。

性能

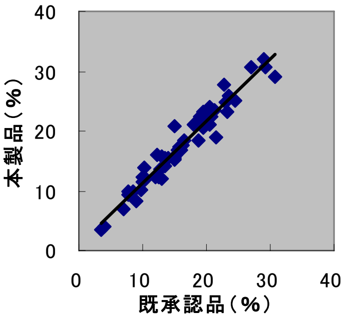
【特異性】

MY4 モノクローナル抗体は、白血球分化抗原に関する国際ワークショップにおいて CD14 のリファレンスモノクローナル抗体として使用されています。

CD14 抗原は、単球及びその前駆細胞と単球由来のマクロファージに広汎に発現しています。正常末梢血単球の約 85%、正常骨髄細胞の 5～10%が MY4 陽性です。MY4 抗体は、同じ CD14 である Mo2 抗体とは異なるエピトープを認識しており、顆粒球にも弱く反応します。骨髄細胞系の細胞株である HL-60 細胞は MY4 がほぼ陰性（約 5%）ですが、分化誘導した HL-60 細胞は MY4 陽性となります。MY4 抗体は、リンパ球、赤血球、血小板、骨髄系コロニー形成細胞（CFU）には通常反応しません。

【相関性】

本品と自社既承認品との相関性は、以下のとおり良好でした。
CD14 陽性率（%）:　y＝ 1.04x ＋0.87　r＝ 0.97 （n＝54）



使用上または取扱上の注意

1. 本品にはアジ化ナトリウムが含まれています。アジ化ナトリウムは酸性下で有毒なアジ化水素酸を産生しますので、取り扱いに十分注意してください。また、アジ化物が金属製の配水管内に蓄積することによる爆発の危険性を避けるため、アジ化物の廃棄は多量の流水で希釈しながら行ってください。
2. 有効期限を過ぎた試薬を使用しないでください。
3. 検体及び検体に触れた器具類は感染の危険性があるものとして取り扱い、適切な表示、処理の後に廃棄してください。
4. ピペットを口で吸引しないでください。また、皮膚や粘膜への検体の接触を避けてください。
5. 保管及びインキュベーション中に試薬を強い光にさらさないでください。
6. 試薬が微生物に汚染されないよう注意してください。
7. 試薬の外観に変化が見られる、あるいはコントロール検体の測定結果に大きな変化がある場合には、試薬劣化の可能性が考えられますので使用しないでください。本品の正常な状態での外観は、無色もしくは淡黄色の透明な液体です。

貯法、有効期限、安定性

サイトスタット　MY4-FITC
冷暗所（2～8℃）保存　　製造後 18 箇月

1. 本品は冷蔵（2～8℃）で遮光して保存してください（凍結は不可）。
2. 有効期限は、各バイアルに明記されています。

包装単位

サイトスタット　MY4-FITC
製品番号　6604110　　容量　50 テスト（0.5mL）

主要文献

1. Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF: Leukocyte Typing: 1984.　Berlin: Springer-Verlag: 108, 407
2. McMichael AJ: Leukocyte Typing III, White Cell Differentiation Antigens: 1987. Oxford: Oxford University Press: 586-589.
3. Todd RF, Griffin JD, Ritz BJ, Nadler LM, Abrams T, Schlossman SF: 1981. Expression of normal monocyte-macropfage differentiation antigens on HL60 promyelocytes undergoing differentiation induced by leukocyte conditioned-medium of phorbol diester.　Leukemia Res 5 : 491-495.
4. Griffin, J.D., RItz, J., Nadler, L.M., and Schlossman, S.F.: 1981. Expression of myeloid differentiation antigens on normal and malignant myeloid cells.　J. Clin. Invest. 68: 932-941.
5. Goyert SM, Ferrero E, Rettig WJ, Yenamandra AK, Obata F, Le Beau MM: 1988. The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. Science 239: 497-500.
6. Pedron T, Girard R, Chaby R: 1995. Variation of LPS-binding capacity, epitope expression, and shedding of membrane-bound CD14 during differentiation of human monocytes.　J Immunol 155: 1460-1471.
7. Kawakami Z, Ninomiya H, Tomiyama J, Abe: 1990. Deficiency of glycosyl-phosphatidylinocitol anchored proteins on paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) neutrophils and monocytes: heterogeneous deficiency of decay-accelerating factor (DAF) and CD16 on PNH neutrophils.　Brit J Haematol 74: 508-513.

**問い合わせ先

ベックマン･コールター株式会社

〒135-0063　東京都江東区有明三丁目５番７号　TOC 有明ウエストタワー
TEL:　0120-566-730　　FAX:　03-5530-2460

**製造販売元

ベックマン･コールター株式会社

〒135-0063　東京都江東区有明三丁目５番７号　TOC 有明ウエストタワー

BECKMAN COULTER